

TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
VETERINARIA**

Inseminación artificial en gatas: Protocolos para inducir la ovulación y técnicas. Revisión bibliográfica.

Alumno: Amparo María Vilar Morera

Tutor: Marta González Clari

Curso académico 2020/2021



AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a varias personas la realización de este trabajo final de grado.

En primer lugar, me gustaría agradecer el trabajo, la confianza y dedicación de mi tutora y directora, la Dr. Marta González, que, sin su ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo. En concreto agradecer que aceptara ser mi tutora en una época vacacional, su guía en la realización de este trabajo, las correcciones realizadas, escucharme y aconsejarme siempre en su despacho y, sobre todo que gracias a ella he podido desarrollar un área de la veterinaria que me entusiasma y, de la cual quiero ampliar mis conocimientos y en un futuro trabajar en ella. Se lo agradezco de corazón.

Agradecer a mis padres y a mi familia el esfuerzo durante todo este tiempo, tanto económico como su constante apoyo moral, dándome ánimo y fuerzas para seguir. Y por seguir apoyándome cada día.

También agradecer a mis amigas, por escucharme, aconsejarme y ayudarme siempre, y demostrarme su apoyo día a día. Porque me han regalado demasiados bonitos momentos en mi vida y me han hecho pasar los mejores 5 años en la universidad que, sin duda, a su lado, los repetiría.

Este último párrafo, se lo quiero dedicar a una persona muy especial, a mi pareja Andrea. Por su apoyo incondicional, y por ayudarme en las decisiones que tomo en mi vida. Por ser mi fuente de inspiración en la vida, la persona que más me ayuda, más fuerza me da, me aconseja y más feliz me hace, y por supuesto, la que más quiero. Por ser el amor de mi vida.

Muchas gracias a todos por apoyarme en mi día a día, porque cada página de este trabajo tiene un poquito de todos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. OVULACIÓN EN LA GATA	2
1.2. TÉCNICAS DE INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN EN LA GATA	5
1.3. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN LA GATA	8
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5. CONCLUSIONES	32
6. BIBLIOGRAFÍA.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLA

Figura 1. Células epiteliales superficiales (flecha fina) y células epiteliales superficiales anucleadas (flecha rellena) [8].	4
Figura 2. Esquema del protocolo para inducir la ovulación en gatas mediante el uso de eCG/hCG.	6
Figura 3. Esquema del protocolo para inducir la ovulación en gatas mediante el uso de eCG/pLH.	7
Figura 4. Esquema del protocolo para inducir la ovulación en gatas mediante el uso de pFSH/hCG.	7
Figura 5. Técnica de inseminación laparoscópica oviductal. A: Vista laparoscópica del ovario izquierdo y la bursa. B: Colocación adecuada de las pinzas de agarre en el borde de la bursal craneomedial. C: Eversión de la bolsa ovárica para identificar el ostium oviductal en la ampolla [23].	10
Figura 6. Inseminación laparoscópica intrauterina en felinos. a: El laparoscopio se usa para identificar el tracto reproductivo; (b) se utilizan pinzas accesorias para coger el cuerno uterino; (c) se eleva el cuerno y se inserta un catéter perforado a través de la pared abdominal ventral en el lumen uterino; y (d) el estilete se retira del catéter y el tubo que contiene los espermatozoides se guía a través del catéter hacia el lumen uterino para depositar los espermatozoides [28].	11
Figura 7. A: Imagen del catéter especial diseñado para la inseminación transcervical endoscópica [27]. B: Catéter propuesto por Zambelli et al. (2005) para la inseminación transcervica, en el recuadro podemos observar la punta del catéter [24].	13
Figura 8. Histerogramas realizados tras cateterismo transcervical endoscópico en dos gatas, en la vista ventrodorsal (a) y vista lateral (b). Las flechas punteadas muestran el catéter transcervical y las flechas continuas muestran el medio de contraste dentro de la luz uterina. En la figura 2a, el medio de contraste llena todo el lumen uterino, mientras que en la figura 2b, la pequeña cantidad de medio de contraste simula el semen infundido durante la inseminación artificial transcervical [27]. 2: Técnicas propuestas por Hurlbut (A), Swanson (B), Chatdarong (C) y Zambelli (D) para cateterismo transcervical en la gata. Catéter transcervical (a), espéculo (b) y catéter para la recogida o transferencia de embriones (c) [24].	14
Figura 9. Ejemplo de búsqueda bibliográfica en PubMed utilizando el termino “artificial insemination in cats”	17
Figura 10. Ejemplo de búsqueda bibliográfica en PubMed utilizando el termino “intrauterine insemination in cats”	18
Figura 11. Comparativa según especie, gonadotropina, semen utilizado y el porcentaje de número de gestaciones [3].	21
Figura 12. Comparativa del número de folículos, CL y fetos según la combinación de gonadotropinas utilizadas [14]. Cuadro rojo: total de folículos, CL y fetos en el lugar de inseminación.	22

Figura 13. Comparativa de la ratio de preñez según la combinación de gonadotropinas exógenas (eCG/hCG o eCG/pLH) [23].	22
Figura 14. Comparativo resumen del número de fetos producidos utilizando la combinación de gonadotropinas eCG/hCG vs eCG/pLH [14].	23
Figura 15. Comparativo resumen del número de sacos gestacionales normales y anormales producidos utilizando la combinación de gonadotropinas eCG/hCG vs eCG/pLH [14]. Cuadrado rojo: Muestra los totales.	23
Figura 16. Comparativo resumen de la ratio de preñez según el tiempo de inseminación [26].	24
Figura 17. Comparativo resumen de las gestaciones obtenidas utilizando las técnicas de inseminación intravaginal vs intrauterina [21]. Cuadro rojo: Resultados de gestación positivo (+) o negativo (-).	25
Figura 18. Inducción al estro y ovulación, tipo de semen utilizado, lugar de la inseminación artificial y el éxito de gestación en gato doméstico (cuadro rojo). Resultados mediante la técnica laparoscópica oviductal (cuadro amarillo) [36].	27
Figura 19. Comparativo resumen de la ratio de concepción en gata doméstica utilizando semen fresco y semen congelado [24].	28
Figura 20. Comparativo resumen de la ratio de concepción en gata doméstica utilizando semen fresco y semen congelado [30].	28
Tabla 1. Resumen de los artículos utilizados según el autor principal, revista, año y temática con la referencia a la bibliografía	20

RESUMEN

Recientemente ha habido un aumento de los estudios reproductivos en gatas debido a su uso como modelo reproductivo para reproducir especies felinas en peligro de extinción. Hoy en día, podemos encontrar varias hormonas para inducir la ovulación en gatas, pero diversos estudios han concluido que la eCG, hCG y pLH son las hormonas que mejores resultados dan en referencia al porcentaje de ovulación. Alcanzando unos altos porcentajes de ovulación, pero resultados diferentes en el porcentaje de gestaciones. Además, hay otros estudios que avalan la utilización de inhibidores foliculares para aumentar la sensibilidad a las gonadotropinas exógenas. Por otro lado, las técnicas también influyen en el éxito de la inseminación artificial. Las técnicas de inseminación intrauterina y laparoscópica oviductal han reportado los mejores resultados, obteniendo un 40-80%, y un 70 – 80% de éxito respectivamente. Los objetivos de esta revisión bibliográfica son la revisión de los protocolos para inducir la ovulación, revisión de las técnicas de inseminación artificial y la proposición de un protocolo de inseminación artificial.

Palabras clave: Inseminación artificial, ovulación, gonadotropinas, técnicas.

ABSTRACT

Recently, there has been an increase in reproductive studies in cats due to their use as a reproductive model to reproduce endangered feline species. Nowadays, we can find several hormones to induce ovulation in cats, but several studies have concluded that eCG, hCG and pLH are the hormones that give the best results in reference to the ovulation percentage. Reaching high ovulation rates, but different results in the pregnancy rate. In addition, there are other studies that support the use of follicular inhibitors to increase sensitivity to exogenous gonadotropins. On the other hand, the techniques also influence the success of artificial insemination. Intrauterine and laparoscopic oviductal insemination techniques have reported the best results, getting 40-80%, and 70-80% of success, respectively. The objectives of this bibliographic review are the review of the protocols to induce ovulation, a review of the artificial insemination techniques and the proposal of an artificial insemination protocol.

Keywords: Artificial insemination, ovulation, gonadotropins, techniques.

1. INTRODUCCIÓN

El perro y el gato son los animales domésticos más comunes y, por tanto, de los que se tiene más conocimiento. Gracias a esto se ha podido conocer y clasificar a los felinos como animales de reproducción poliéstrica estacional y de ovulación inducida. Esto último quiere decir que la inducción de la ovulación depende de una estimulación vagino-cervical derivada de la cópula. En cualquier caso, se ha observado que la estimulación no física es muy necesaria para inducir la ovulación, es decir, factores como la estimulación visual, olfatoria, auditiva y las feromonas, son muy importantes para la ovulación [1].

En los últimos años ha habido una creciente publicación de estudios reproductivos de los gatos, esto se debe a que se están investigando nuevos métodos para poder conservar a las especies felinas salvajes en peligro de extinción, además de conseguir un mayor conocimiento acerca de la ovulación inducida y otras enfermedades humanas [2].

La reproducción asistida de los gatos comprende diferentes aspectos [3]:

1. Inducción de la ovulación: Existen diferentes métodos y protocolos.
2. Inseminación artificial (AI/IA), con diferentes técnicas donde cada una proporciona diferentes resultados, además de la dificultad de ejecución.
3. Fertilización *in vitro*.
4. Transferencia de embriones.

1.1. OVULACIÓN EN LA GATA

Como se ha descrito anteriormente, las gatas son poliéstricas estacionales y de ovulación inducida, aunque las gatas que se encuentran en casas “*indoor*” pueden tener variaciones en su ciclo, es decir, pueden ser poliéstricas continuas.

Las gatas son más activas desde el punto reproductivo, cuando hay mayor número de horas en el día, esto significa que, el anestro ocurrirá cuando los días son más cortos, aunque depende del lugar en el que se encuentre. De esta manera que su ciclo puede ser muy variado en cuanto a la duración del ciclo estral, la duración de la temporada reproductiva y el número de ciclos a lo largo del año. Esto significa que, podemos modificar de manera artificial el momento en el cual la gata va a entrar en proestro.

Podemos añadir de manera artificial más horas de luz, entre 10 – 14h de luz [4, 5], de esta manera modificaremos la duración del anestro y la gata entrará en ciclo a los $15,6 \pm 0,5$ días [5].

El ciclo estral de la gata cuenta con cuatro fases [6, 7]:

- Proestro: Es la fase anterior al estro. Se caracteriza por el aumento de la actividad reproductiva y la gata presenta folículos ováricos desarrollándose y el cuerpo lúteo (CL) del anterior ciclo desapareciendo, además, de un aumento del cortisol circulante. Puede que genere interés en el macho, pero no permite la cópula, y suele durar entorno a 24 horas aproximadamente.

- Estro: La gata presenta un desarrollo folicular avanzado y los niveles de cortisol máximos. Permite la cópula y, se pueden observar cambios en el comportamiento. Se produce el desarrollo final de los folículos y la ovulación ocurre horas después de la cópula.

Estas dos fases, proestro y estro se conocen como fase folicular del ciclo estral. Mientras que el metaestro y diestro, como fase lútea.

- Metaestro: Es la fase siguiente al estro, donde las células de la teca y de la granulosa se transforman en células luteínas (lúteas), que son las responsables de la formación del cuerpo lúteo.

- Diestro: Los folículos se transforman en cuerpo lúteo funcional, segregando progesterona independientemente de que haya habido concepción. En caso de que se haya producido la fecundación, los niveles de progesterona se mantendrán gracias al cuerpo lúteo hasta que la placenta segregue la progesterona.

- Anestro: no hay actividad reproductiva en la gata, el desarrollo folicular es mínimo, aunque podemos encontrar CL, estos no son funcionales y están retrocediendo.

A nivel hormonal, el hipotálamo es el responsable de liberar de manera pulsátil la hormona gonadotropina (GnRH), que actuará a nivel de la hipófisis y producirá la liberación de hormona foliculoestimulante (FSH) y de hormona luteinizante (LH) mediante el sistema portal hipotálamo-hipofisario. Estas últimas hormonas actuarán sobre los folículos, permitiendo su desarrollo y posteriormente la ovulación [6].

Existen diferentes opciones para la detección del estro en la gata, el comportamiento físico de la gata cambia durante el estro (el cual se puede definir como estro receptivo). Podemos

observar cambios comportamentales como pueden ser vocalizaciones, agacharse, pisar, afecto, rodar, lordosis, maullidos, poliuria, etc [8]. También se puede confirmar que la gata está en estro mediante una citología vaginal, en la cual observaremos una vagina cornificada debido al aumento de las concentraciones de estradiol $17-\beta$ con presencia de células epiteliales superficiales nucleadas y anucleadas vaginales y neutrófilos [8] (Figura 1), o mediante el uso de sonda de ultrasonidos.

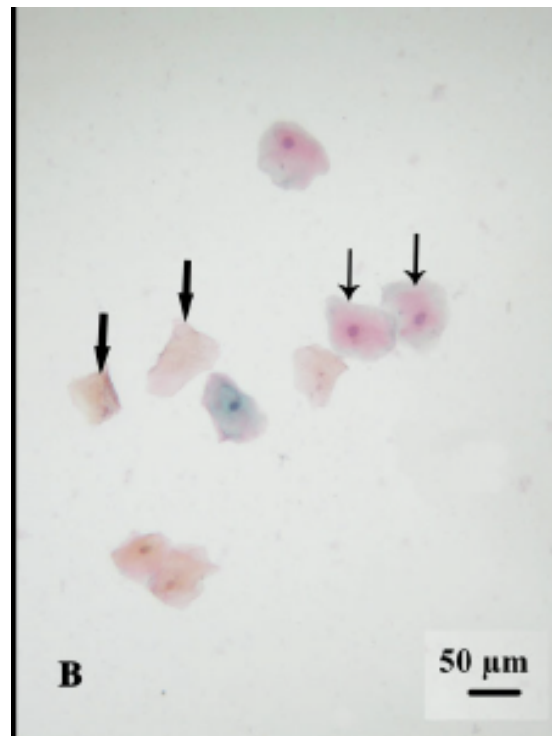


Figura 1. Células epiteliales superficiales (flecha fina) y células epiteliales superficiales anucleadas (flecha rellena) [8].

También se ha visto que frecuentemente las gatas necesitan de varias cópulas para que ocurra la ovulación [5, 9]. Es este estímulo, la penetración, lo que causa un aumento de la hormona gonadotropina y, en consecuencia, un pico de la hormona luteinizante (LH), que 24 – 48h más tarde, provocará la ovulación [10].

La ovulación espontánea también ocurre en las gatas, y aunque casi siempre necesitan de la cópula para ovular, se ha demostrado que hay diferentes patrones en los que un animal puede combinar ovulación espontánea e inducida [7].

1.2 TÉCNICAS DE INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN EN LA GATA

Para obtener éxito en la reproducción artificial hay que tener en cuenta que hay muchos factores que pueden hacer fracasar la reproducción. Se deben identificar esos factores, cómo interactúan entre sí, y controlarlos en la medida de lo posible para poder llevar a cabo con éxito la reproducción. Uno de los factores más importantes es garantizar una respuesta normal y constante en el ovario para la ovulación, ya que la respuesta a los tratamientos hormonales puede ser diferente o incluso no existir respuesta. Otros factores que también influyen son la calidad del semen o la técnica utilizada [3].

Antes de empezar con un protocolo de inducción de la ovulación y de IA, hay que realizar un examen físico general y otro reproductivo, además de diferentes pruebas complementarias al animal para conocer su estado de salud, así como, si posee alguna patología que le pueda dificultar la reproducción. Se debe evaluar mediante el uso de una sonda de ultrasonido el estado del útero, simetría de los cuernos, si hay aumento del endometrio o cualquier anomalía que pueda ser causa de infertilidad [11].

Debido a que el ciclo estral del gato doméstico es muy variable, se suele utilizar una sonda de ultrasonidos (ecógrafo) para hacer un seguimiento de la maduración folicular y de esta manera encontrar el mejor momento para inducir la ovulación. Aunque se puede utilizar una citología vaginal para detectar el momento del estro [8].

Generalmente se utilizan las siguientes hormonas para estimular e inducir la ovulación [3]:

1. pFSH (FSH porcina): Su uso principal es para estimular el desarrollo folicular. La principal desventaja de esta hormona es que para conseguir su efecto se necesita aplicar 1 o 2 inyecciones durante 3 – 6 días.
2. Gonadotropina coriónica equina (eCG): Se utiliza principalmente para estimular el desarrollo folicular, y al contrario que la FSH, tiene una alta vida media y solo es necesaria una inyección. La principal desventaja es que se crean anticuerpos contra la gonadotropina y disminuye la respuesta ovárica a ésta si se administra con mucha frecuencia.
3. pLH (LH porcina): Provoca la maduración final del ovocito y la ovulación. La principal desventaja es la necesidad de administrar varias inyecciones.

4. Gonadotropina coriónica humana (hCG): Provoca la maduración oocitaria y la ovulación. Tiene un efecto duradero y efectivo. La principal desventaja es la misma que la eCG, la creación de anticuerpos.

Se ha observado que el uso de gonadotropinas exógenas puede alterar el ambiente ovárico y, con ello, disminuir la calidad ovocitaria, además de dificultar la implantación y la gestación. Además, se ha observado que puede causar problemas de fertilidad debido a la hiperestimulación ovárica, que causa elevados niveles de estrógenos, progesterona o luteólisis prematura. En los felinos, se ha observado que la hCG actúa de manera secundaria como foliculogénica, produciendo folículos secundarios [37]

Hay diferentes terapias hormonales para provocar el estro y la ovulación en las gatas [3]:

Uno de los protocolos más comunes para inducir el estro es la combinación de eCG y hCG. Se administra una sola inyección de eCG y 80 – 84h más tarde una inyección de hCG para inducir la ovulación y otra en el día 4 del estro. La inseminación se produce 30 – 33h después. Este protocolo tiene una tasa de más del 45% de éxito [3]. También es posible la aplicación de una sola dosis de hCG después de observar el estro de manera natural [2, 11, 12, 13] (Figura 2).

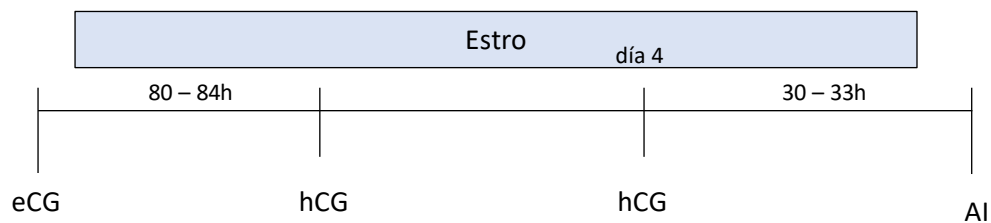


Figura 2. Esquema del protocolo para inducir la ovulación en gatas mediante el uso de eCG/hCG.

Otro protocolo de inducción que se ha utilizado mucho es la combinación de eCG y pLH. Primero se inyecta la eCG (100 iu) y 85h más tarde una inyección de pLH (1000 iu) intramuscular, con IA después de la segunda inyección de gonadotropina a las 30 – 33h. Este protocolo es efectivo para inducir la ovulación, pero según la bibliografía, forman y ovulan una menor cantidad de ovocitos auxiliares en comparación con el protocolo anterior, ya que en el protocolo eCG/hCG el exceso de ovocitos auxiliares también pueden haber sido fertilizados, además de tener más sitios de implantación embrionaria [14, 15] (Figura 3).

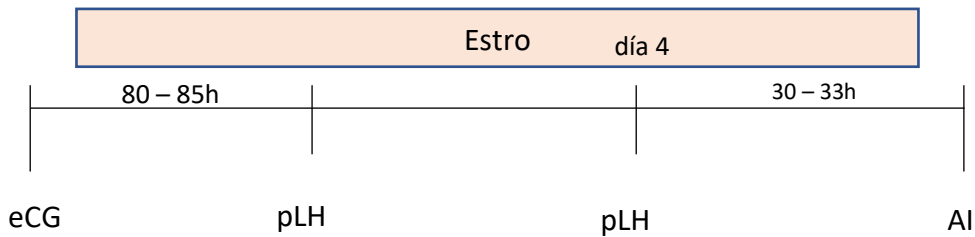


Figura 3. Esquema del protocolo para inducir la ovulación en gatas mediante el uso de eCG/pLH.

Aunque las hormonas más utilizadas para la estimulación ovárica son la eCG y la hCG, también se han realizado algunos estudios con el uso de la pFSH en combinación con la hCG. Se administra durante 5 días consecutivos la hormona pFSH y, tras visualizar el típico comportamiento del estro en la gata, en los días 2 y 4 de este comportamiento, se administran dos inyecciones de hCG (100 iu) seguidas de una inseminación intrauterina en la primera inyección y después de una segunda inyección de hCG [5] (Figura 4).

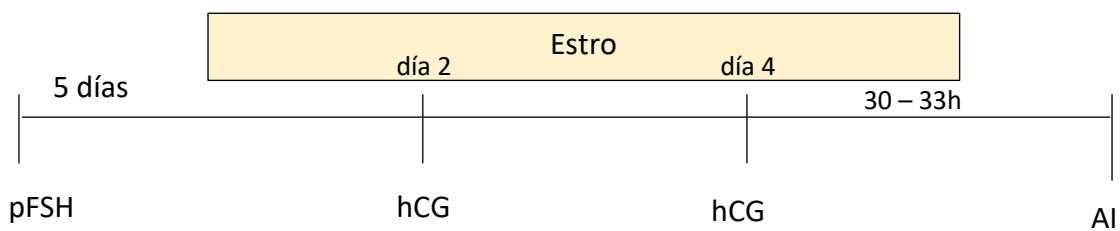


Figura 4. Esquema del protocolo para inducir la ovulación en gatas mediante el uso de pFSH/hCG.

Además de estos protocolos, se ha observado que inhibir la función ovárica antes de inducir incrementa el éxito de ovulación. Hay dos maneras de inhibir la función ovárica, mediante el cuerpo lúteo, produciendo su lisis o vía folicular. En gatas, la luteólisis no es la técnica de elección ya que, al ser de ovulación inducida, el cuerpo lúteo que encontramos en el diestro es refractario a las prostaglandinas, por lo que la mejor opción es la inhibición folicular [3].

Se ha estudiado que un ovario inactivado es más fácil que de un respuesta uniforme y eficaz frente a gonadotropinas exógenas que un ovario sin un protocolo de inhibición ovocitaria. De esta manera se pueden aprovechar al máximo los protocolos de inducción [3].

En gatas, para inhibir la actividad folicular, se utilizan cuatro hormonas: levonorgestrel, melatonina, análogos GnRH y progesterona. Se ha observado que la utilización previa de levonorgestrel da como resultado ovulaciones más consistentes y predecibles, ya que mejora la respuesta ovárica a las gonadotropinas exógenas [3].

También se ha experimentado con el uso de melatonina oral para inhibir la función ovárica junto con 12 – 14h horas sin luz e inducir la ovulación mediante eCG/hCG. Se observó que la melatonina inhibe de manera efectiva la función ovárica, y sirve principalmente para reducir la hiperestimulación ovárica [16].

En cuanto a la progesterona, previene la ovulación espontánea, incrementa la sensibilidad ovárica frente a las gonadotropinas y asegura un entorno endocrino normal [17].

También se ha estudiado el uso de acetato de deslorelina como análogo de la GnRH para inhibir la función ovárica con resultados exitosos para inducir el estro, así como producir estros fértiles [18].

1.3. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN LA GATA

La reproducción artificial ofrece muchas ventajas. En un principio se utilizaba como método para prevenir la transmisión de enfermedades, pero actualmente es el método más económico, fácil, con mayor seguridad sanitaria y relativamente sencillo para la reproducción. Esto es debido a que con un eyaculado se pueden obtener varias dosis de semen para inseminar, lo que, en términos económicos, reduce la presencia de machos, con el consecuente ahorro económico del mantenimiento de estos [23].

Asimismo, también permite la mejora genética, pudiendo seleccionar a los individuos con mejores características para la reproducción, ya sea tanto para granja como para la reproducción en criadores, programas de crío o incluso para la reproducción de animales en peligro de extinción [19].

Actualmente existen diferentes técnicas de inseminación en la gata:

- INSEMINACIÓN VAGINAL [11]:

Se utiliza principalmente cuando disponemos de semen fresco. Se realiza insertando un catéter TomCat con el extremo abierto en la cúpula de la vagina, depositando el semen y elevando las extremidades traseras durante 10 minutos, de esta manera evitaremos el reflujo.

Es una técnica complicada, tanto por el comportamiento de la gata como por la estimulación reproductiva que se realiza. Además, no se realiza una sedación o anestesia a la gata, como ocurre en la mayoría de las otras técnicas.

- INSEMINACIÓN VAGINAL PROFUNDA [11, 20]:

Esta técnica requiere de sedación profunda o anestesia general. Consiste en, una vez la gata está sedada o anestesiada y en decúbito dorsal, se introduce una sonda de 2 milímetros (mm) de diámetro y 9 centímetros (cm) de largo para dilatar la cúpula vaginal. Posteriormente, la pipeta de inseminación se inserta 3 – 4 cm en el canal vaginal, donde se deposita el semen. Seguidamente se elevan las extremidades posteriores durante 15 - 20 minutos para evitar el reflujo.

- INSEMINACIÓN OVIDUCTAL LAPAROSCÓPICA [11, 22, 23]:

Ésta es la técnica más empleada para la inseminación en gatas, ya que esta técnica permite obtener altas tasas de preñez utilizando un número bajo de espermatozoides (1×10^6 espermatozoides móviles en 5ml). De esta manera permite con poca cantidad de espermatozoides, que pueden provenir de ejemplares valiosos pero con mala calidad o poca cantidad seminal, conseguir una gestación. Las dos principales desventajas es la complejidad de la técnica y el equipo a utilizar.

Este método se realiza bajo anestesia general y mediante un equipo de laparoscopia se buscan e identifican los ovarios. Una vez localizados, con unos fórceps atraumáticos se identifica y se sujeta el borde craneomedial de la bolsa ovárica. Esta bolsa se abre y se vuelve del revés para permitir la visualización del ostium oviductal. Se inserta un catéter vía percutánea lo más próximo a la bolsa ovárica, y a través de este catéter, se inserta una aguja de 22 G con una jeringa a 2 cm de profundidad en el ostium oviductal. Posteriormente se inyecta la dosis de semen (Figura 5).

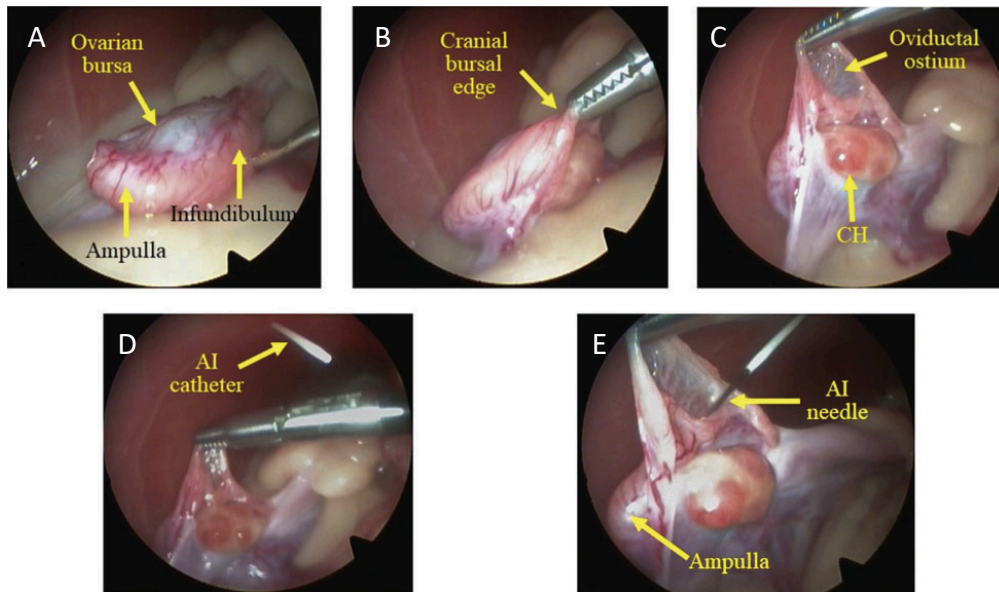


Figura 5. Técnica de inseminación laparoscópica oviductal. A: Vista laparoscópica del ovario izquierdo y la bursa. B: Colocación adecuada de las pinzas de agarre en el borde de la bursal craneomedial. C: Eversión de la bolsa ovárica para identificar el ostium oviductal en la ampolla [23].

- INSEMINACIÓN LAPAROSCÓPICA INTRAUTERINA [13, 14, 21]:

Se realiza anestesia general, y se procede a efectuar una laparotomía. Se realiza una incisión en la línea media para la laparotomía y se buscan y exponen los cuernos. Con unas pinzas de agarre atraumáticas se sujeta el cuerno a la pared abdominal. Se inserta un catéter con una aguja de 22G en el tercio proximal de la luz intrauterina con la punta del catéter dirigida hacia craneal, avanzando 2 cm, mientras la aguja continua en el sitio de penetración. Posteriormente, se extrae la aguja y se inserta otro catéter dentro del anterior que contiene la dosis del semen que se va a depositar en la unión uterotubal (Figura 6).

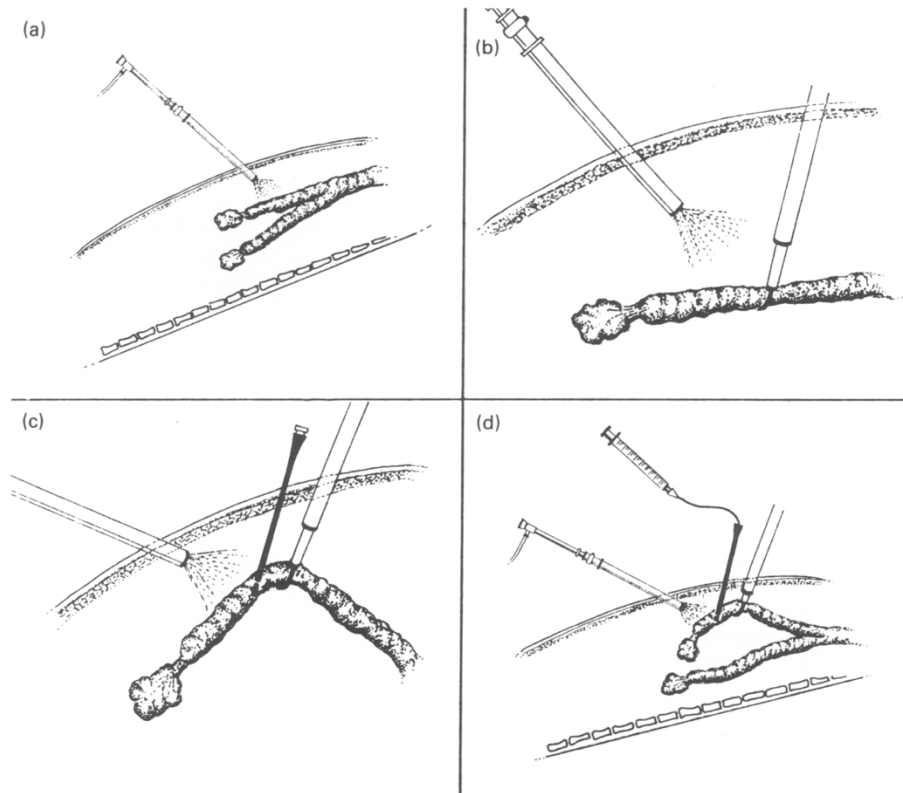


Figura 6. Inseminación laparoscópica intrauterina en felinos. a: El laparoscopio se usa para identificar el tracto reproductivo; (b) se utilizan pinzas accesorias para coger el cuerno uterino; (c) se eleva el cuerno y se inserta un catéter perforado a través de la pared abdominal ventral en el lumen uterino; y (d) el estilete se retira del catéter y el tubo que contiene los espermatozoides se guía a través del catéter hacia el lumen uterino para depositar los espermatozoides [28].

- INSEMINACIÓN POR CATERIZACIÓN TRANSCERVICAL [24, 25]:

Para este procedimiento hay dos maneras de realizar la inseminación, cuya principal diferencia es el catéter utilizado.

Primero se anestesia de manera general a la gata.

El primer modelo está basado en el espéculo que contiene el catéter propuesto por Swanson, Godke y Chatdarong, que se avanza manteniendo el agujero en su aspecto dorsal. Una vez alcanzado el fondo del saco vaginal, el catéter que contiene el espéculo se empuja y sale a través de un orificio situado en la parte superior, de manera que accede al cuello uterino.

La desventaja de esta técnica es que el tamaño del espéculo es demasiado grande, a veces, más grande que la vagina, de manera que no se consigue alcanzar el final de la vagina, por lo que el catéter no puede entrar por el orificio.

El segundo catéter, realizado por Zambelli y Cunto, es de menor tamaño por lo que se consigue llegar hasta el final de la vagina, pero a la vez que estamos introduciendo el catéter el veterinario introduce su dedo por el recto de la gata de manera que puede ir palpando el catéter a lo largo de la vagina. Una vez el catéter ha alcanzado el fondo de la vagina, se retira hacia atrás unos mm y se localiza la apertura del cérvix con ayuda del dedo empujando hacia abajo, y moviendo el catéter ligeramente hacia arriba, se introduce el catéter por el cuello uterino. Se puede confirmar que el catéter está correctamente situado mediante ultrasonido (Figura 7).

Cuando se ha introducido el catéter en el cuello uterino, se deposita el semen a 2 cm craneal al cérvix.

Estudios posteriores a Zambelli, modificaron el tamaño del catéter propuesto por Swanson, Godke y Chatdarong, disminuyéndolo, de manera que el principal problema, se solucionó [26].

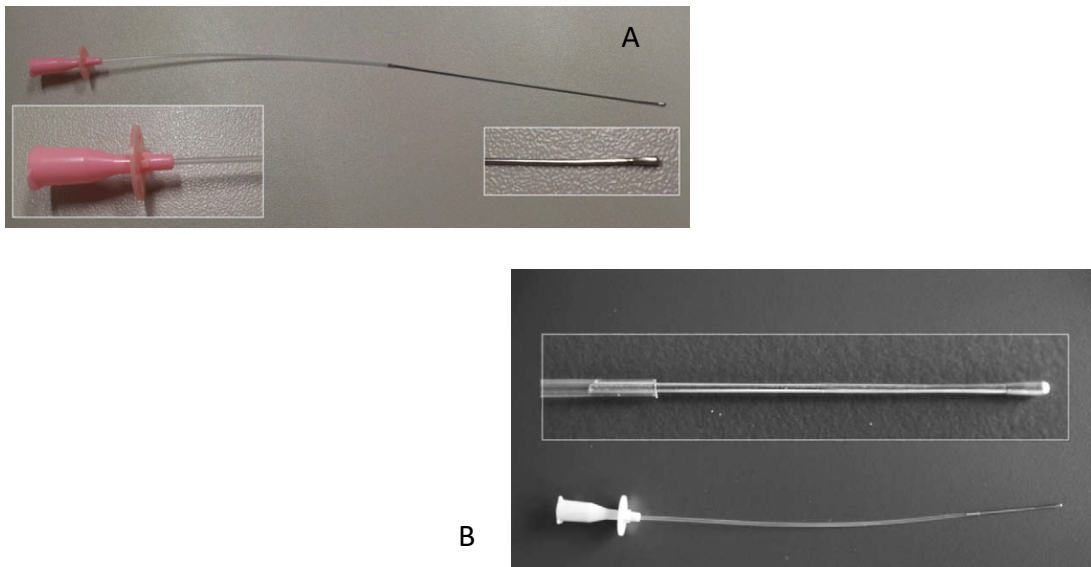


Figura 7. A: Imagen del catéter especial diseñado para la inseminación transcervical endoscópica [27]. B: Catéter propuesto por Zambelli et al. (2005) para la inseminación transcervical, en el recuadro podemos observar la punta del catéter [24].

- INSEMINACIÓN ENDOSCÓPICA TRANSCERVICAL [26, 27]:

Se procede a anestesiarse de manera general a la gata. Una vez anestesiada, se posiciona en decúbito esternal con la pelvis ligeramente elevada. Se utiliza un endoscopio para la visualización del cérvix. Se inserta en el vestíbulo de la vaginal y se avanza cranealmente hasta que se observa el cérvix y el pliegue dorsal.

Se utiliza un catéter especial diseñado para esta técnica, y que consiste en una sonda urinaria que presenta el extremo con una aguja de acero que se inserta junto al endoscopio (Figura 8), y se observa entrar la aguja en el cérvix. Una vez insertada la aguja, se retira el endoscopio y en el mismo catéter se deposita el semen.

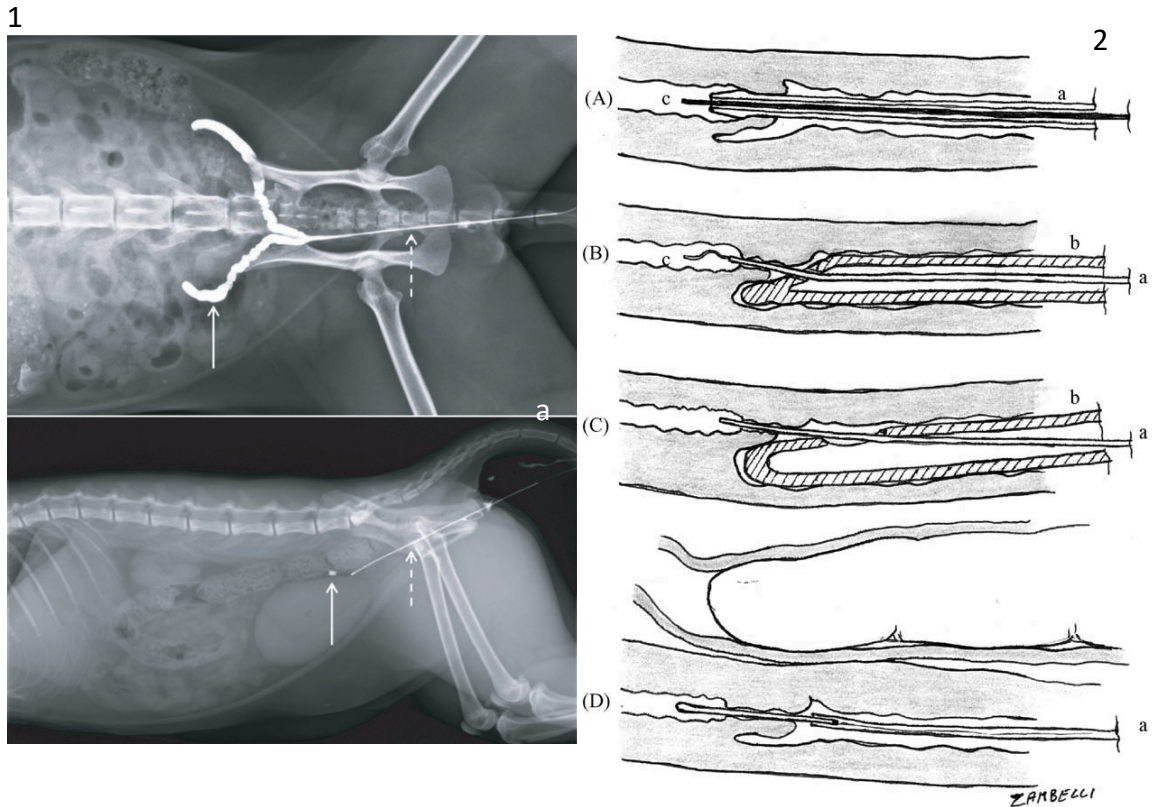


Figura 8. Histerogramas realizados tras cateterismo transcervical endoscópico en dos gatas, en la vista ventrodorsal (a) y vista lateral (b). Las flechas punteadas muestran el catéter transcervical y las flechas continuas muestran el medio de contraste dentro de la luz uterina. En la figura 2a, el medio de contraste llena todo el lumen uterino, mientras que en la figura 2b, la pequeña cantidad de medio de contraste simula el semen infundido durante la inseminación artificial transcervical [27]. 2: Técnicas propuestas por Hurlbut (A), Swanson (B), Chatdarong (C) y Zambelli (D) para cateterismo transcervical en la gata. Catéter transcervical (a), espéculo (b) y catéter para la recogida o transferencia de embriones (c) [24].

La mayoría de las técnicas requieren de sedación profunda o anestesia general para poder ser realizadas, pero esta anestesia es efectuada después de la ovulación. Esto es debido a que si realizamos la anestesia cuando no se ha producido la ovulación, y tenemos folículos preovulatorios, estos folículos no ovularán y obtendremos una baja tasa de preñez [12, 28]. Aunque estudios más recientes pueden estar contradiciendo esta teoría.

Tanto la técnica como la calidad, dosis, y conservación del semen, nos van a influir en el éxito de la inseminación artificial. La dosis general que mayor tasa de preñez tiene es 8×10^6 espermatozoides [29], esta dosis puede variar en función de la técnica.

También se ha observado que, la utilización de semen fresco o semen congelado influye de manera significativa en el éxito de la inseminación, siendo el semen fresco el que mayor éxito tiene [30].

Gracias al aumento de estudios, se han encontrado diferentes protocolos para inducir la ovulación y diversas técnicas de inseminación artificial (IA) en la gata. Dependiendo de los recursos de los que dispongamos podemos elegir unas técnicas u otras, del mismo modo la disponibilidad de las hormonas en el país en el que nos encontremos influirá en la utilización de unos protocolos u otros.

Es por ello, que esta revisión bibliográfica comparará los diferentes protocolos y técnicas de inseminación artificial con el fin de llegar a la conclusión de cuáles son las técnicas y protocolos más utilizados y con mayor éxito de reproducción.

2. OBJETIVOS

El objetivo de una revisión bibliográfica es la investigación documental sobre un tema concreto, en este caso, esta revisión tiene varios objetivos:

1. Realizar una revisión de los protocolos existentes para inducir la ovulación en gatas, cuáles son las hormonas más utilizadas, y qué combinaciones de hormonas son las más utilizadas y las que mayor éxito de ovulación tienen.
2. Realizar la revisión de cuales son las técnicas de inseminación artificial existentes en gatas, así como las ventajas y desventajas de cada técnica, qué técnica es la más empleada y con la que mayor tasa de preñez se obtiene.
3. Proponer un protocolo para la inducción de la ovulación junto a una técnica de inseminación artificial con la que podamos obtener el mayor éxito de reproducción, en base a los estudios que se han realizado y la bibliografía estudiada.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Los resultados obtenidos en la revisión bibliográfica se dividen en los resultados encontrados en los protocolos de inducción a la ovulación y los resultados obtenidos de las técnicas de inseminación.

Para los resultados de los protocolos de inducción a la ovulación se han utilizado diversos artículos de estudios experimentales, así como varios artículos que resumen la información, hallados principalmente en PubMed.

Los criterios de búsqueda utilizados para hallar los diversos protocolos de inducción a la ovulación son “Induction of ovulation in cats”, “Artificial insemination in cats”, “Estrus induction in cats” (Figura 9).

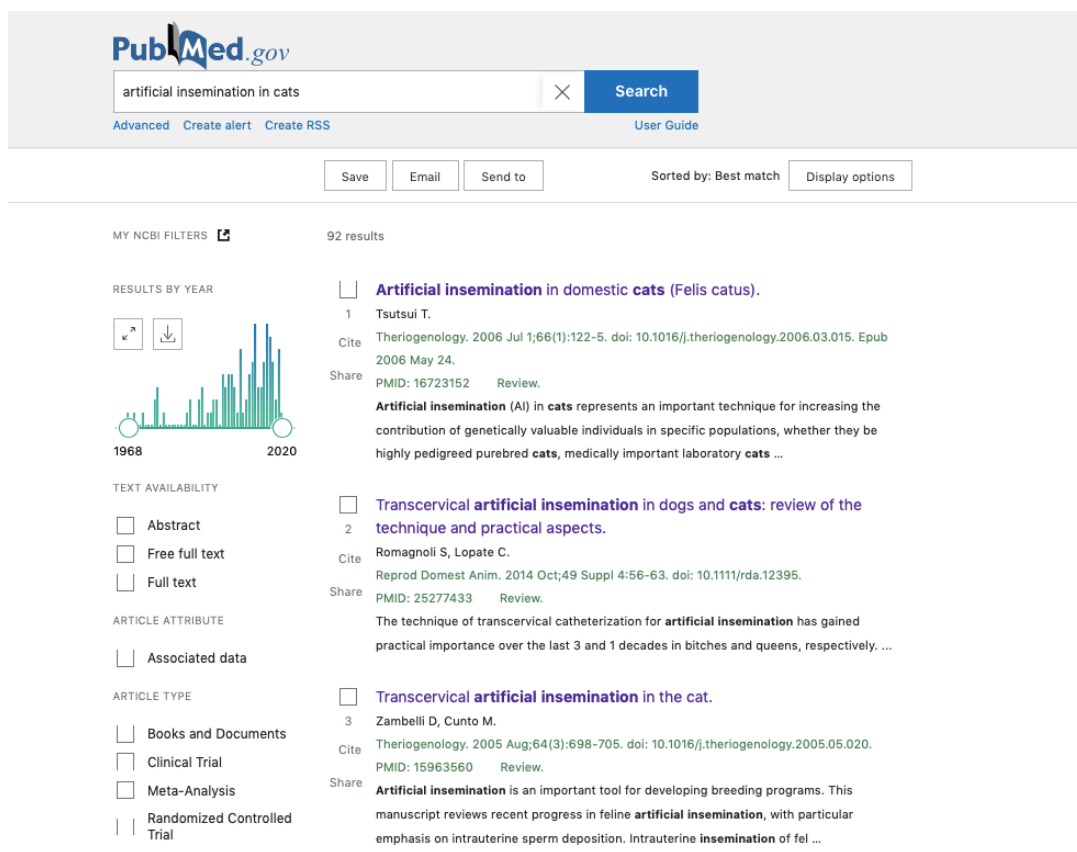


Figura 9. Ejemplo de búsqueda bibliográfica en PubMed utilizando el termino “artificial insemination in cats”.

Se seleccionaron artículos recientes, tanto experimentales como revisiones. En las revisiones, se hacía mención a otros artículos, los cuales se incluían en esta revisión, ya que se estudiaban y se obtenían conclusiones propias. También se cambiaban las palabras claves en el motor de búsqueda, de manera que se iba ampliando, utilizando palabras como “eCG ovulation induction in cats”, “hCG in cats”, etc.

Para la búsqueda de las técnicas de inseminación se ha utilizado principalmente como motor de búsqueda PubMed, utilizando como referencia las técnicas mencionadas en los artículos obtenidos en la búsqueda de protocolos para inducir la ovulación en gatas. Por este motivo, se han utilizado palabras claves como las técnicas, “Laparoscopic oviductal insemination in cats”, “Intrauterine insemination in cats”. Se han utilizado artículos experimentales y revisiones lo más actualizados posible. Asimismo, se buscaron resultados de las mismas técnicas en otros felinos (Figura 10).

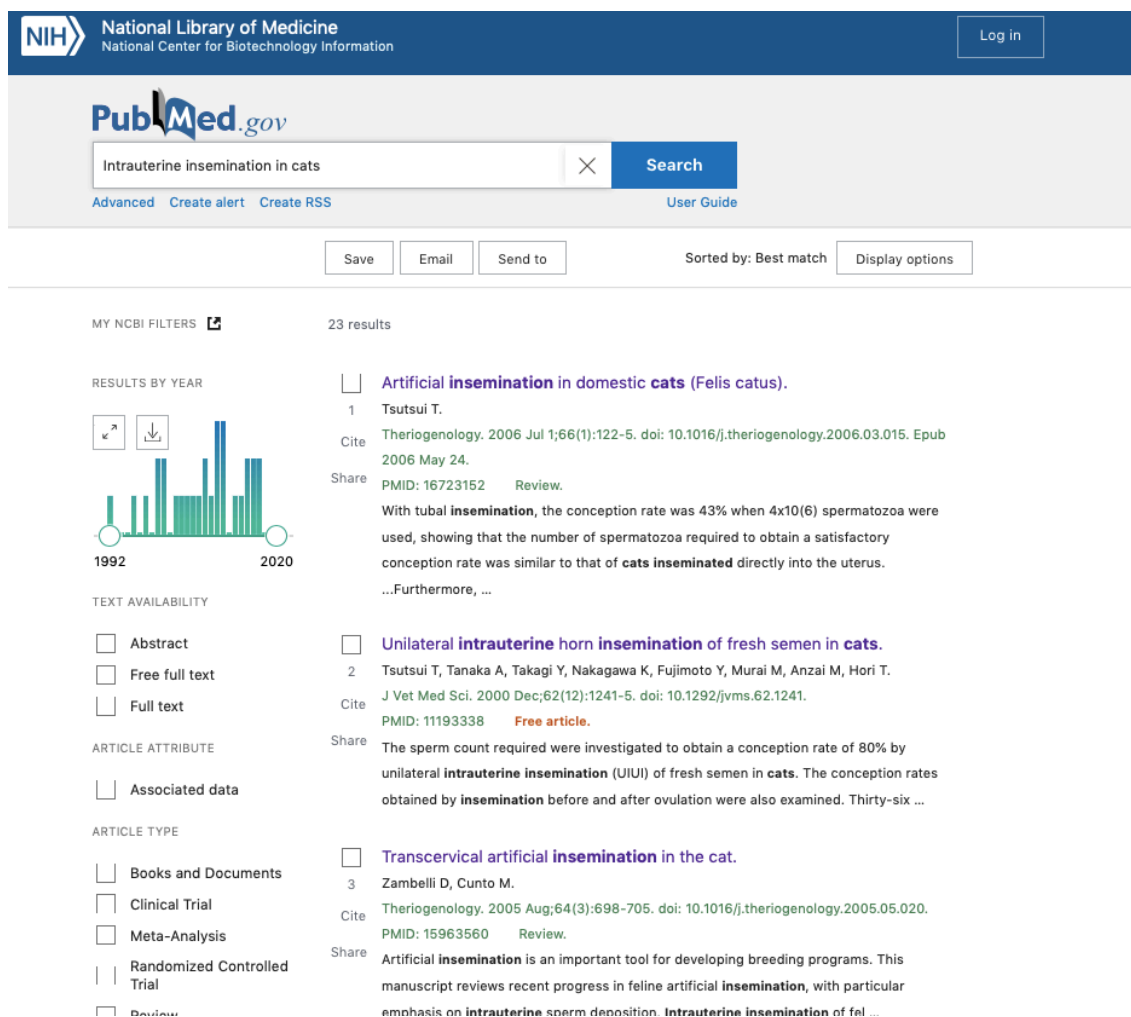


Figura 10. Ejemplo de búsqueda bibliográfica en PubMed utilizando el termino “intrauterine insemination in cats”.

Para obtener todos estos resultados se ha realizado una búsqueda exhaustiva de los diferentes aspectos de la reproducción artificial en gatas.

En general, los artículos utilizados son a partir del 2000, a excepción de 5 artículos más antiguos que hemos visto necesario incluir por ser citados continuamente en los artículos más recientes.

En la tabla 1 podemos observar un resumen de los autores, revista, temática y año de los artículos utilizados.

<i>Autor</i>	<i>Revista</i>	<i>Año</i>	<i>Temática</i>	<i>Referencia</i>
<i>Axnér E</i>	Reprod Dom Anim	2008	Fisiología reproductiva y AI	2
<i>Lambo CA</i>	Reprod Dom Anim	2012	Técnica inseminación	15
<i>Swanson WF</i>	Reprod Dom Anim	2012	Técnica inseminación	22
<i>Romagnoli S</i>	Reprod Dom Anim	2014	Técnica inseminación	25
<i>Zambelli D</i>	Reprod Dom Anim	2015	Técnica inseminación	27
<i>Zambelli D</i>	Reprod Dom Anim	2005	Técnica inseminación	35
<i>Pelican KM</i>	Theriogenology	2006	Inseminación artificial	3
<i>Kutzler MA</i>	Theriogenology	2007	Control ovárico	5
<i>Graham LH</i>	Theriogenology	2003	Control ovárico	16
<i>Zambelli D</i>	Theriogenology	2015	Control ovárico	18
<i>Zambelli D</i>	Theriogenology	2005	Técnica inseminación	24
<i>Chatdarong K</i>	Theriogenology	2007	Técnica inseminación	26
<i>Tsutsui T</i>	Theriogenology	2006	Inseminación artificial	29
<i>Howard JG</i>	Theriogenology	2009	Inseminación artificial	32
<i>Thongphakdee A</i>	Theriogenology	2020	Inseminación artificial	36
<i>Thongphakdee A</i>	Theriogenology	2018	Control ovárico	37
<i>Graham LH</i>	Theriogenology	2000	Ambiente ovárico	38
<i>Brown JL</i>	Anim Reprod Sci	2011	Control ovárico	7
<i>Villaverde AISB</i>	Anim Reprod Sci	2009	Técnica inseminación	21
<i>Kanca H</i>	Aust Vet J	2014	Detección estro	8
<i>Chakraborty PK</i>	Vet Clin North Am Small Anim Pract	1982	Control ovárico	9
<i>Johnson AK</i>	Vet Clin North Am Small Anim Pract	2018	Inseminación artificial	11
<i>Banks DH</i>	Biol Reprod	1982	Control ovárico	10

<i>Conforti VA</i>	Biol Reprod	2013	Técnica inseminación	14
<i>Roth TL</i>	Biol Reprod	1997	Inseminación artificial	31
<i>Howard JG</i>	Biol Reprod	1997	Inseminación artificial	33
<i>Tsutsui T</i>	J Vet Med Sci	2000	Técnica inseminación	12
<i>Tsutsui T</i>	J Vet Med Sci	2000	Técnica inseminación	13
<i>Tanaka A</i>	J Vet Med Sci	2000	Técnica inseminación	20
<i>Stewart RA</i>	Reprod Fertil Dev	2015	Control ovárico	17
<i>Swanson WF</i>	Reprod Fertil Dev	2019	Técnica inseminación	23
<i>Howard JG</i>	J Reprod Fert	1992	Anestesia	28
<i>Rijsselaere T</i>	Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift	2010	Inseminación artificial	30
<i>Tipkantha W</i>	J Zoo Wildl Med	2017	Técnica inseminación	34

Tabla 1. Resumen de los artículos utilizados según el autor principal, revista, año y temática con la referencia a la bibliografía

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cada protocolo para inducir la ovulación y la técnica utilizada para la inseminación artificial tiene diferentes resultados, que servirán de orientación para la utilización de unos u otros protocolos y técnicas.

Por ello los siguientes resultados hacen referencia a la tasa de ovulación utilizando las diferentes pautas hormonales:

En la figura 1 podemos observar que el porcentaje de gestaciones conseguidas utilizando la eCG y hCG como hormonas principales para inducir la ovulación es de 50 - 58%. Estos resultados son sin previo uso de hormonas para inhibir la función ovárica [3].

Successful ovarian stimulation protocols for intrauterine AI in felid species

Species	Average body weight (kg)	Gonadotropins and dosages		Type of sperm	Number of pregnancies (%)	References
Domestic cat	2	100 IU eCG	100/75 IU hCG	Fresh	9/18 (50.0)	[29]
Domestic cat	2	Natural estrus	200 IU hCG	Frozen	8/14 (57.1)	[79]
Tigrina	2	200/100 IU eCG	150/75 IU hCG	Fresh	1/4 (25.0)	[30]
Ocelot	9	500 IU eCG	225 IU hCG	Fresh and frozen	1/4 (25.0)	[16]
Clouded leopard	15	100 IU eCG	75 IU hCG	Fresh	1/20 (5.0)	[15,26]
Snow leopard	30	600 IU eCG	300 IU hCG	Fresh	1/15 (6.7)	[33]
Cheetah	35	200 IU eCG	100 IU hCG	Fresh	6/13 (46.2)	[26]
Puma	35	200 IU eCG	100 IU hCG	Fresh	1/9 (11.1)	[32]
Tiger	250	1000 IU eCG	750 IU hCG	Fresh	2/7 (28.6)	[34,35]

Figura 11. Comparativa según especie, gonadotropina, semen utilizado y el porcentaje de número de gestaciones [3].

Otro de los protocolos que se utilizan es la combinación de eCGy pLH, la combinación de estas hormonas da como resultado que ambas produzcan la ovulación en un 100%, del mismo modo que el anterior protocolo (eCG/hCG) [14].

Como se ha comentado, no existen diferencias significativas entre la utilización de eCG/hCG y eCG/pLH en lo que se refiere al número de folículos o número de gestaciones, 75 % frente a 63% respectivamente, siendo ligeramente superior en la combinación de eCG/hCG, como podemos observar en la figura 13 [14].

La principal diferencia entre estos dos protocolos es en el número de cuerpos lúteos observados, siendo mayor cuando se utiliza eCG/hCG (Figuras 12 y 13) [14,23].

TABLE 2. Number of follicles and CL at AI and on Day 20 post-AI and number of fetuses by dam according to gonadotropin treatment and insemination site.

Treatment	LO side					LU side				
	Follicles		CL		Fetuses ^a	Follicles		CL		Fetuses ^a
	AI	Day 20	AI	Day 20		AI	Day 20	AI	Day 20	
eCG/pLH										
Female 1	5	0	0	0	0	3	0	2	2	1
Female 3	0	0	11	18	4	3	0	8	26	0
Female 5	2	2	4	5	3	2	2	5	5	2
Female 7	0	1	12	8	0	0	3	12	14	0
Female 9	0	3	4	2	0	0	7	5	5	0
Female 11	1	0	3	4	1	4	0	2	5	0
Female 13	0	5	1	3	2	0	5	3	4	0
Female 15	1	1	8	10	0	0	3	7	6	0
Total	9	12	43	50	10	12	20	44	67	3
Mean	1.1	1.5	5.4	6.2		1.5	2.5	5.5	8.4	
SEM	0.6	0.6	1.6	2.0		0.6	0.9	1.2	2.8	
No. of fetuses (mean \pm SEM) ^b								2.6 \pm 0.6		
eCG/hCG										
Female 2	8	0	6	48	6	4	1	5	40	2
Female 4	0	0	4	22	8	0	0	7	17	0
Female 6	0	0	4	2	0	2	2	2	3	0
Female 8	0	7	5	13	7	0	9	10	18	3
Female 10	0	3	17	28	3	2	2	12	23	4
Female 12	10	2	9	22	0	9	0	10	24	1
Female 14	0	0	4	4	0	1	1	2	2	0
Female 16	2	1	6	10	2	4	1	8	17	0
Total	20	13	55	149	26	22	16	56	144	10
Mean	2.5	1.6	6.9	18.6		2.7	2.0	7.0	18.0	
\pm SEM	1.4	0.9	1.6	5.3		1.0	1.0	1.3	4.3	
Total no. of fetuses/AI site (LO or LU)					36					13
No. of fetuses (mean \pm SEM) ^b								6.0 \pm 1.0		

^a Total number of normal and abnormal fetuses.^b Mean number of fetuses for pregnant cats only.

Figura 12. Comparativa del número de folículos, CL y fetos según la combinación de gonadotropinas utilizadas [14]. Cuadro rojo: total de folículos, CL y fetos en el lugar de inseminación.

pLH, porcine LH; hCG, human chorionic gonadotrophin; SOY, soy lecithin-based extender; TEY, test egg yolk-based extender; URF, ultrarapid freezing; HCM, hypertrophic cardiomyopathy; CHS, Chediak Higashi syndrome; MPS, mucopolysaccharidosis

Gonadotropin regimen	Semen status	Motile spermatozoa per oviduct	Pregnancy rate (%)	Reference
eCG-pLH	Fresh	1×10^6 (unilateral)	50 (4/8)	Conforti <i>et al.</i> (2013)
eCG-hCG	Fresh	1×10^6 (unilateral)	63 (5/8)	Conforti <i>et al.</i> (2013)
eCG-pLH	Fresh	1×10^6 (unilateral)	47 (7/15)	Lambo <i>et al.</i> (2012)
	Frozen	1×10^6 (unilateral)	20 (3/15)	
eCG-pLH	Frozen (SOY)	$2-3 \times 10^6$ (unilateral)	38 (5/13)	C. Lambo, unpubl. data
	Frozen (TEY)	$2-3 \times 10^6$ (unilateral)	38 (5/13)	
eCG-pLH	Fresh	1×10^6 (unilateral)	75 (6/8)	Swanson <i>et al.</i> (2014)
	Frozen	1×10^6 (unilateral)	63 (5/8)	
eCG-pLH ^A	Fresh	1×10^6 (unilateral)	71 (5/7)	Swanson <i>et al.</i> (2014)
	Frozen	1×10^6 (unilateral)	71 (5/7)	
eCG-pLH ^A	Frozen (URF)	2×10^6 (bilateral)	100 (3/3)	Johnson <i>et al.</i> (2015)
eCG-pLH	Frozen (HCM)	$0.5-4 \times 10^6$ (bilateral)	57 (4/7)	Swanson <i>et al.</i> (2012)
eCG-pLH ^A	Frozen (CHS)	1.5×10^6 (bilateral)	67 (2/3)	W. Swanson, unpubl. data
eCG-pLH	Frozen (MPS)	1.5×10^6 (bilateral)	67 (2/3)	W. Swanson, unpubl. data

^APretreatment with oral progestin for ovarian suppression (see text for details).

Figura 13. Comparativa de la ratio de preñez según la combinación de gonadotropinas exógenas (eCG/hCG o eCG/pLH) [23].

Otra diferencia es que la utilización de eCG/hCG tiende a producir más fetos que en las hembras en las cuales se ha inducido la ovulación mediante eCGh/pLH, 4,5 frente a 1, así como, mayor número de sacos gestacionales [14] (Figura 14).

TABLE 3. Number of follicles (diameter, ≥ 2 mm) and CL at AI and on Day 20 post-AI and number of fetuses by gonadotropin treatment group.^a

Gonadotropin regimen	Follicles		CL		Fetuses ^b
	AI	Day 20	AI	Day 20	
eCG/hCG	5.2 \pm 2.4	3.6 \pm 1.8	13.8 \pm 2.0	38.0 \pm 5.3	4.5 \pm 1.5
eCG/pLH	2.6 \pm 1.0	4.0 \pm 1.5	10.9 \pm 1.4	14.6 \pm 2.4	1.6 \pm 0.7
P-value	>0.05	>0.05	>0.05	~0.06	~0.1

^a Values are mean \pm SEM.

^b Mean number of fetuses for all females (n = 8 per group).

Figura 14. Comparativo resumen del número de fetos producidos utilizando la combinación de gonadotropinas eCG/hCG vs eCG/pLH [14].

Del mismo modo se ha observado que el uso de eCG/hCG tiende a una mayor incidencia de anomalías y un mayor número de sacos gestacionales vacíos que en la utilización de eCG/pLH. Aun así, las gatas que han sido tratadas mediante la eCG, mostraron una mayor producción de embriones de buena calidad que llegaron a producir blastocistos [31] (Figura 15).

TABLE 4. Number of gestational sacs (GS) and abnormalities in pregnant eCG/pLH- and eCG/hCG-treated cats following AI.

Treatment	Total GS	Normal GS (normal fetuses) ^a	Abnormal GS			Total abnormal GS
			Normal fetus ^b	Abnormal fetus ^c	Without fetus ^d	
eCG/pLH						
Female 1	1	1	—	—	—	—
Female 3	4	4	—	—	—	—
Female 5	5	5	—	—	—	—
Female 11	1	1	—	—	—	—
Female 13	2	2	—	—	—	—
Total	13	13	0	0	0	0
eCG/hCG						
Female 2	11	8	—	—	3	3
Female 4	9	7	—	1	1	2
Female 8	11	6	3	1	1	5
Female 10	8	4	1	2	1	4
Female 12	3	1	—	—	2	2
Female 16	2	2	—	—	—	—
Total	44	28	4	4	8	16
P-value	0.05	>0.05	>0.05	<0.1	<0.05	<0.05

^a GS containing normal placenta and normal fetus.

^b Abnormal placenta.

^c Three (of four) had abnormal placenta, and one (of four) had a normal placenta.

^d Four (of eight) had normal placenta, and four (of eight) did not have a placenta.

Figura 15. Comparativo resumen del número de sacos gestacionales normales y anormales producidos utilizando la combinación de gonadotropinas eCG/hCG vs eCG/pLH [14]. Cuadrado rojo: Muestra los totales.

Otro método utilizado par inducir la ovulación es mediante la combinación de hCG/pFSH. La combinación de estas hormonas induce la ovulación, aunque la respuesta ovárica y las tasas de ovulación están muy relacionadas con la dosis de FSH. Las principales desventajas que se han observado es que se produce una hiperestimulación ovárica y a dosis muy altas produce degeneración embrionaria “in vitro”, así como la necesidad de 1 o 2 inyecciones diarias durante 2 – 6 días consecutivos [5].

Además, se ha observado que la realización de inseminación artificial 30h después de la segunda inyección da mejores resultados en tasa de preñez que hacer la inseminación artificial en el momento de la inyección de la gonadotropina (Figura 16).

K. Chatdarong et al./Theriogenology 68 (2007) 1326–1333

1331

Table 5

Summary of outcome in domestic queens following AI (IVI = intravaginal insemination; IUI = intrauterine insemination) of fresh or frozen-thawed semen

AI method	No. cats given hCG	No. cats ovulating	Type of semen used	Total pregnancy rate	Pregnancy rate in queens that ovulated
IVI at time of hCG	7	7	Fresh	28.6% (2/7)	28.6% (2/7)
hCG and IVI 28 h later	8	7	Fresh	37.5% (3/8)	42.9% (3/7)
IVI at time of hCG	12	12	Frozen	0% (0/12)	0% (0/12)
IUI at time of hCG	12	11	Frozen	41.7% (5/12)	45.5% (5/11)

Figura 16. Comparativo resumen de la ratio de preñez según el tiempo de inseminación [26].

Estos serían los resultados obtenidos de los diferentes protocolos para inducir la ovulación en gatas. Como se ha comentado, la técnica empleada en la realización de la inseminación artificial también influye en el éxito, y que analizaremos a continuación.

La inseminación intravaginal es una de las primeras técnicas utilizadas para inseminar a las gatas, aunque no es muy empleada hoy en día. En un estudio se observó que tiene una tasa de concepción de un 77,8%, aunque el número de fetos es menor [20] que en otro estudio publicado en donde se obtuvo un 0% de concepciones utilizando esta técnica [21].

Otra técnica utilizada es la inseminación intrauterina, que ha demostrado tener una tasa de concepción del 80%. En la figura 17 podemos observar una comparativa del número de gestaciones entre la inseminación vaginal y la intrauterina. Siendo esta última significativamente mayor (6 resultados positivos) a dosis de semen parecidas [32].

Table 2

Pregnancy results obtained after intrauterine or intravaginal AI, number of embryo vesicles observed with 18–21 d after AI and quantity of motile sperm and sperm quality in each insemination.

Insemination method	Tom	Queen no.	Pregnancy result (+/-)	Number of embryo vesicles	Motile sperm/insemination (10 ⁶)	Total motility (%)	PMI (%)	Normal acrosome (%)
IUI	A	13	+	4	33.1	46	48	61.5
		15	+	3	42.2	56	44	64.0
		16	+	2	35.5	52	49	61.0
		30	+	1	42.5	54	46	60.5
	B	8	+	1	45.9	62	48	54.5
		28	+	1	25.5	36	45	62.5
		3	-	0	42.8	55	52	58.0
		29	-	0	36.0	48	42	45.5
IVAI	A	11	-	0	35.1	49	46	46.5
		12	-	0	42.0	53	42	57.5
		14	-	0	42.6	60	42	53.0
		16	-	0	43.2	57	43	56.0
	B	19	-	0	42.0	61	38	43.0
		24	-	0	41.4	53	43	52.0
		25	-	0	43.6	59	49	53.0
		26	-	0	32.5	44	41	49.5
Mean ± S.D.				2.0 ± 1.3	39.1 ± 5.5	52.8 ± 6.9	44.9 ± 3.7	54.9 ± 6.4

IUI (intrauterine artificial insemination); IVAI (intravaginal artificial insemination); PMI (plasma membrane integrity).

Figura 17. Comparativo resumen de las gestaciones obtenidas utilizando las técnicas de inseminación intravaginal vs intrauterina [21]. Cuadro rojo: Resultados de gestación positivo (+) o negativo (-).

La inseminación intrauterina también ha sido utilizada en guepardos y en pantera nebulosa, consiguiendo una tasa de concepción del 46,3% en guepardos, mientras que en la pantera nebulosa no se consiguió ninguna gestación debido a la mala calidad del semen [33].

La técnica más utilizada, según la bibliografía es la inseminación oviductal laparoscópica, esta técnica, se utiliza tanto para felinos domésticos como para felinos salvajes, y ha ido mejorando su tasa de concepción, así como la forma de realizar la técnica minimizando la herida y obteniendo unos resultados del 63% de tasa de preñez, y produciendo un mayor número de fetos, un 73% [14, 35].

En un artículo publicado en el año 2017 se realizó con éxito la inseminación artificial de una pantera nebulosa mediante esta técnica, obteniendo en este caso una tasa de concepción del 50% con un 78% de número de fetos [34].

La mayor ventaja de estas técnicas, inseminación intrauterina y laparoscópica oviductal, es la necesidad de utilización de una dosis de semen menor y el acercamiento al lugar de fecundación, el oviducto.

La inseminación transcervical es una técnica más reciente, que esta siendo desarrollada, no hay muchos estudios respecto a ella y proporciona bajos niveles de éxito. Sin embargo, esta misma técnica utilizando un endoscopio se realizó de manera exitosa en un 85,71% [27]. En general, se ha observado que se obtiene una tasa de concepción del 41,7% [27].

Estos resultados pueden deberse a las modificaciones que sufre la vagina durante la fase folicular como el incremento de la longitud del fórnix. Y una reducción de la altura de la vagina craneal [35]

A continuación, en la figura 18, podemos observar una comparativa según las hormonas utilizadas para inducir el estro, el tipo de semen (fresco o congelado) y el lugar de la inseminación artificial. Siendo la técnica de inseminación artificial por laparoscopia oviductal la que mayor éxito genera en el gato doméstico teniendo en cuenta el éxito de la gestación (100%), mientras que la utilización de la inseminación intravaginal con semen congelado da como resultado el porcentaje más bajo, 10,7% [36, 37].

Table 1
Estrus and ovulation inductions, sperm types and site of AI on pregnancy success in domestic and wild felids.

Body size	Species	Estrus/ovulation induction	Sperm type	AI mean/sperm deposition	Pregnancy success (%)	References
Small (<6.5 kg)	Domestic cat	natural estrus/hCG	Fresh	Vagina	7/9 (77.81)	[92]
	Domestic cat	natural estrus/pFSH/hCG	Frozen	Vagina	6/56 (10.7)	[93]
	Domestic cat	natural estrus/hCG	Fresh	Laparotomy intrauterine	8/10 (80)	[90]
	Domestic cat	natural estrus/hCG	Frozen	Laparotomy intrauterine	8/14 (57.1)	[94]
	Domestic cat	natural estrus/hCG	Frozen	Transcervical	5/12 (41.7)	[5]
	Domestic cat	eCG/pLH	Fresh	LO	3/3 (100)	[12]
	Leopard cat	eCG/hCG	Fresh/Frozen	LU	2/2 (100)	[95]
	Amur leopard cat	eCG/hCG	Fresh	Laparotomy intrauterine	1/2 (50)	[96]
	Tigrina	eCG/hCG	Fresh	LU	1/4 (25)	[97]
	Pallas's cat	eCG/pLH	Fresh	LO	1 pregnant	[98]
Medium (7–30 kg)	Ocelot	eCG/hCG	Fresh	LU	1/4 (25)	[99]
	Ocelot	eCG/hCG	Frozen	LU	1/4 (25)	[97]
	Ocelot	eCG/pLH	Fresh	LO	1 pregnant	[98]
	Clouded leopard	eCG/hCG	Fresh	LU	1/20 (5)	[35,100]
	Clouded leopard	eCG/pLH	Fresh	LO	1/4 (25)	[101]
	Clouded leopard	eCG/pLH	Frozen	LO	1 pregnant	[102]
	Snow leopard	eCG/hCG	Fresh	LU	1/15 (6.7)	[86]
Large (35–135 kg)	Leopard	natural estrus/hCG	Fresh	Transcervical	1/1 (100)	[103]
	Cheetah	pFSH/hCG	Fresh/Frozen	Transcervical	0/23 (0)	[104]
	Cheetah	eCG/hCG	Fresh	LU	6/13 (46.2)	[35]
	Cheetah	eCG/hCG	Frozen	LU	3/11 (27.2)	[35,105]
	Puma	eCG/hCG	Fresh	LU	1/8 (12.5)	[106]
	Tiger	eCG/hCG	Fresh	LU	1/10 (10)	[11,107]
	Amur tiger	eCG/pLH	Fresh	LO	1 pregnant	[108]
	Lion	natural estrus/GnRH	Fresh	Vaginal/Transcervical	4/14 (28.6)	[88]

Abbreviation: LU, laparoscopic uterine; LO, laparoscopic oviductal AI.

Figura 18. Inducción al estro y ovulación, tipo de semen utilizado, lugar de la inseminación artificial y el éxito de gestación en gato doméstico (cuadro rojo). Resultados mediante la técnica laparoscópica oviductal (cuadro amarillo) [36].

La primera inseminación en gatas fue hace 45 años depositando semen fresco recién recolectado en la vagina de hembras tratadas con hCG estruales naturalmente [14].

La inseminación artificial depende de varios factores, entre ellos encontramos los protocolos utilizados para inducir la ovulación, el lugar y momento de la inseminación (técnica), la calidad y forma de conservación del semen [36].

En la siguiente tabla podemos observar una comparativa del porcentaje de la tasa de concepción utilizando semen fresco y semen congelado a distintas dosis y en diferentes técnicas.

Como podemos observar en las siguientes tablas (figura 19 y 20), coinciden las conclusiones obtenidas en los diferentes experimentos, es decir, la utilización de semen fresco da mejores resultados obteniendo desde un 40% a un 80% de ratio de concepción frente al 10% - 57% cuando se utiliza semen congelado.

Table 2
Conception rates in domestic cats inseminated with fresh or frozen-thawed semen

Estrus	Semen	No. sperm ($\times 10^6$)	Semen volume (μL)	Site of insemination	Conception rate (%)	Author
Natural	Fresh	5	100	Intravaginal	42.9	Sojka et al. [2]
Natural	Fresh	80	50–100	Intravaginal	77.8	Tanaka et al. [3]
Induced (FSH)	Frozen	50–100	100	Intravaginal	10.6	Platz et al. [1]
Induced (eCG)	Fresh	4.2–7.5	200	Bilateral intrauterine (surgical)	34.4	Howard et al. [13]
Natural	Fresh	8	30	Unilateral intrauterine (surgical)	80.0	Tsutsui et al. [4]
Natural	Frozen	50	30	Unilateral intrauterine (surgical)	57.1	Tsutsui et al. [5]

Figura 19. Comparativo resumen de la ratio de concepción en gata doméstica utilizando semen fresco y semen congelado [24].

Table 2. Pregnancy results obtained after AI in the cat with fresh and frozen-thawed semen.

Type of Sperm	Deposition Site	Number of cats	Sperm dose	Pregnancy rate	References
Fresh	Vaginal	26	5-50 $\times 10^6$	40-67%	Sojka <i>et al.</i> , 1970
Fresh	Vaginal (2x)	8	5 $\times 10^6$	77%	Sojka <i>et al.</i> , 1970
Fresh	Vaginal	9	80 $\times 10^6$	77.8%	Tanaka <i>et al.</i> , 2000
Fresh	Intra-uterine	10	8 $\times 10^6$	80%	Tsutsui <i>et al.</i> , 2000
Frozen	Vaginal	56	50-100 $\times 10^6$	10.6%	Platz and Seager, 1978
Frozen	Intra-uterine	14	50 $\times 10^6$	57%	Tsutsui <i>et al.</i> , 2000
Frozen	Intra-uterine	12	20 $\times 10^6$	41.7%	Chatdarong <i>et al.</i> , 2007

Figura 20. Comparativo resumen de la ratio de concepción en gata doméstica utilizando semen fresco y semen congelado [30].

Estos resultados coinciden con los publicados por Tsutsui *et al.* [12, 13] donde compararon la eficacia del uso de semen fresco y semen congelado utilizando la misma técnica, la inseminación intrauterina. En este caso, la tasa de concepción fue del 80% utilizando una dosis de semen de 8×10^6 , mientras que en la utilización del semen congelado fue del 57,1% utilizando una dosis de semen mayor, 50×10^6 .

Por tanto, la utilización de semen fresco dará mejores tasas de concepción que la utilización de semen congelado [23, 30].

En referencia a las técnicas, hay varios autores, Johnson [11], Villaverde [21] y Conforti *et al.* [14], que coinciden en que la técnica menos utilizada es la inseminación artificial por la anatomía de la hembra, tasa de concepción y número de fetos llevados a termino, así como por la necesidad de elevadas dosis de semen.

Con esta técnica se obtienen relativamente altos porcentajes en la tasa de concepción (50%) pero con la necesidad de utilizar un alto número de espermatozoides para obtener una concepción consistente [14].

Sin embargo, las dos técnicas que mejores resultados obtienen son la inseminación intrauterina y la inseminación laparoscópica oviductal, siendo ésta última la que mejores resultados da en tasa de concepción, número de fetos, etc. [14]

Mediante la técnica de inseminación intrauterina podemos llegar a obtener una tasa de concepción de un 75 – 80% según Villaverde [21], Tsutsui *et al.* [12] en contraste con Lambo *et al.* [15] que encontró resultados de gestación del 40 – 70%, ambos resultados son porcentajes elevados de tasas de concepción. Para las especies salvajes esta técnica se utiliza como protocolo estándar para la reproducción, aunque poco a poco se está introduciendo la inseminación laparoscópica oviductal, como podemos observar en Tipkantha W *et al.* [34].

Por medio de la inseminación laparoscópica oviductal obtenemos un alto porcentaje de gestaciones (70 – 80%) con una producción de fetos de un 73%, como nos muestra Conforti *et al.* [14] en comparación con la inseminación intrauterina, que produce un 27% con un bajo número de espermatozoides ($2 - 3 \times 10^6$).

Respecto a la inseminación transcervical, se trata de una técnica relativamente “nueva” en los felinos, y hay pocos estudios que la abarquen. Sin embargo, la anatomía de la vagina de la gata hace que la cateterización sea difícil, tal y como se explica en Zambelli *et al.* [24]. Aunque la técnica propuesta en este estudio reduce el riesgo de trauma en la vagina se necesita menor cantidad de semen que en la inseminación vaginal, pero se necesita una dosis alta para conseguir un porcentaje de concepción del 57,1%, aunque el semen utilizado en este experimento fue congelado, lo que influye en la tasa de concepción. Asimismo, la experiencia del técnico que está realizando la técnica también influye en el éxito de la inseminación.

Sin embargo, esta misma técnica con la ayuda de un endoscopio proporciona una mayor tasa de éxito (85,71%). Del mismo modo sigue existiendo las complicaciones asociadas a la anatomía de la hembra, ya que en Zambelli *et al.* [18] no se logró la inseminación en dos de las gatas. Además, en las hembras que se inseminó no se produjo una gestación.

Otro de los factores que influye en el éxito de la inseminación artificial es el uso de hormonas para inducir la ovulación. La mayoría de los experimentos revisados en esta bibliografía utilizaron como protocolo de inducción la combinación de eCG/hCG o eCG/pLH.

Ambas hormonas hCG y pLH desarrollan múltiples folículos ováricos que ovulan a las 30 – 33h después de la segunda inyección. El número medio de folículos no varía mucho entre el uso de una hormona u otra, pero las gatas tratadas con eCG/hCG resultó en un aumento del número de cuerpos lúteos a los 20 días después de la IA mientras que el número de cuerpos lúteos para eCG / pLH no se vió modificaciones [14].

Ambas hormonas produjeron un número similar de gestaciones, las hembras tratadas con hCG produjeron un 75% frente al 63% que produjeron las hembras tratadas con pLH [14].

Según Conforti *et al.* [14], Swanson [23] y Johnson [11], las hembras tratadas con eCG/hCG tienden a producir más fetos que las hembras tratadas con pLH. Sin embargo, según Lambo *et al.* (2012) la combinación de eCg/hCG puede generar folículos secundarios y CL que pueden interrumpir el ambiente endocrino postovulatorio, mientras que la pLH, al tener una vida media más corta no forma folículos secundarios. Mientras que Graham [38] resalto que este ambiente endocrino, no influye en la calidad folicular o embrionaria.

Las dosis de hormonas utilizadas principalmente, por su éxito, son de 100 IU en eCG, y 75, 100 o 250 IU en hCG, esta última dosis se utiliza cuando se administra una única inyección en lugar de dos [15].

Otro factor que está en estudio es la influencia de la anestesia sobre la inducción de la ovulación y tasa de concepción, pero aun esta por estudiar. Hay estudios como Swanson *et al.* [23], Howard *et al.* [28] en las que se observa la influencia de la anestesia con menores ovulaciones y una tasa de concepción más baja cuando se realiza la inseminación artificial antes de la inyección hCG. Sin embargo, Tsutsui *et al.* [12, 13] y Tanaka *et al.* [20] no encontraron que la anestesia tuviera influencia en la ovulación y/o en la tasa de concepción.

5. CONCLUSIONES

Como conclusiones de esta revisión bibliográfica podemos definir que en relación con los protocolos para inducir la ovulación la combinación de eCG/hCG sería la primera elección, seguida de la combinación eCG/pLH. Debido a que, aunque la utilización de eCG/hCG da lugar a una hiperestimulación ovárica, ésta no influye en la calidad folicular y sin embargo proporciona ligeramente mejores resultados que la combinación de eCG/pLH.

Además, esta combinación supondría una ventaja si disponemos de un escaso número de espermatozoides, de mala calidad o provenientes de felinos en peligro de extinción, en los cuales, la mejor opción es asegurarse el éxito en la gestación.

En referencia a las técnicas utilizadas, podemos concluir que las técnicas que mejores resultados proporcionan son la inseminación intrauterina y la inseminación laparoscópica oviductal. Aunque la técnica más empleada ha sido la intrauterina, los últimos estudios han demostrado la eficacia, mejores resultados y el aumento de la utilización de la inseminación laparoscópica oviductal es la técnica de elección.

Con la información recogida en esta revisión podemos concluir que un buen protocolo de inseminación artificial podría ser:

1. Utilización de la progesterona como inhibidor de la función ovárica de manera que incrementemos la sensibilidad y la respuesta a las gonadotropinas exógenas.
2. Protocolo de inducción con la combinación de eCG/hCG con una sola inyección eCG y 80 – 84h más tarde una inyección de hCG (100 iu) para inducir la ovulación y otra (100 iu) en el día 4 del estro.
3. Se realiza la inseminación laparoscópica oviductal 30 – 33h después de la última inyección.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Kauffman AS, Rissman EF. Neuroendocrine Control of Mating-Induced Ovulation. En: Plant TM, Zeleznik AJ. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 4a ed. Reino Unido: Elsevier; 2014. Pág. 2283 – 2326.
2. Axnér E. Updates on Reproductive Physiology, Genital diseases and Artificial Insemination in the Domestic Cat. *Reprod Dom Anim*. [Internet]. 2008 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (43): 144 – 149. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18638116/>
3. Pelican KM, Wildt DE, Pukazhenthil B, Howard J. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology*. [Internet]. 2006 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (66): 37 – 48. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16630653/>
4. Chatdarong K. Reproductive Physiology of the Female Cat [Tesis doctoral]. Suecia: Swedish University of Agricultural Sciences. 2003.
5. Kutzler MA. Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology*. [Internet]. 2007 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (68): 354 – 374. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17582484/>
6. Robinson B, Noakes DE. Reproductive Physiology of the female. En: Noakes DE, Parkinson T, England G. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 10ª ed. Reino Unido: Elsevier; 2019. Pág. 2 – 34.
7. Brown JL. Female reproductive cycles of wild female felids. *Anim Reprod Sci*. [Internet]. 2011 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (121): 155 – 162. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20888156/>
8. Kanca H, Karakas K, Dalgic MA, Salar S, Izgur H. Vaginal cytology after induction of ovulation in the queen: comparison of postestrus and dioestrus. *Aust Vet J*. [Internet]. 2014 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (92): 65 – 70. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24571340/>
9. Chakraborty PK, Wildt DE, Seager SWJ. Induction of Estrus and Ovulation in the Cat and Dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. [Internet]. 1982 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (12): 85 – 92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7048716/>

10. Banks DH, Stabenfeldt G. Luteinizing Hormone in the Cat response to coitus on consecutive days os Estus. Biol Reprod. [Internet]. 1982 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (26): 603 – 611. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7200811/>
11. Johnson AK. Assisted Reproduction in the female cat. Vet Clin North Am Small Anim Pract. [Internet]. 2018 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (48): 523 – 531. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29656770/>
12. Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, et al. Unilateral Intrauterine Horn Insemination of Fresh Semen in Cats. J Vet Med Sci. [Internet]. 2000 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (62): 1241 – 1245. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11193338/>
13. Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, et al. Unilateral Intrauterine Horn Insemination of Frozen Semen in Cats. J Vet Med Sci. [Internet]. 2000 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (62): 1247 – 1251. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11193339/>
14. Conforti VA, Bateman HL, Schook MW, Newsom J, Lyons LA, Grahn RA, et al. Laparoscopic Oviductal Artificial Insemination Improves Pregnancy Success in Exogenous Gonadotropin – Treated Domestic Cats as a Model for Endangered Felids. Biol Reprod. [Internet]. 2013 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (89): 1 – 9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23699391/>
15. Lambo CA, Grahn RA, Lyons LA, Bateman HL, Newson J, Swanson WF. Comparative Fertility of Freshly Collected vs Frozen – Thawed Semen wit Laparoscopic Oviductal Artificial Insemination in Domestic Cats. Reprod Dom Anim. [Internet]. 2012 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (47): 284 – 288. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23279520/>
16. Graham LH, Swanson WF, Wildt DE, Brown JL. Influence of oral melatonin on natural and gonadotropin – induced ovarian function in the domestic cat. Theriogenology [Internet]. 2003 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (61): 1061 – 1076. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15036995/>

17. Stewart RA, Crosier AE, Pelican KM, Pukazhenthil BS, Sitzmann BD, Porter TE, et al. Progesterone priming before gonadotrophin stimulation and AI improves embryo development and normalises luteal function in the cat. *Reprod Fertil Dev.* [Internet]. 2015 [Consultado 3 de Agosto]. Volumen (27): 360 – 371. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24300570/>
18. Zambelli D, Bini C, Küster DG, Molari V, Cunto M. First deliveries after estrus induction using deslorelin and endoscopic transcervical insemination in the queen. *Theriogenology* [Internet]. 2015 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (84): 773–778. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26092701/>
19. Parkinson TJ, Morrell J. Artificial insemination. En: Noakes DE, Parkinson T, England G. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 10ª ed. Reino Unido: Elsevier; 2019. Pág. 746 – 777.
20. Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto, Hori T, Tsutsui T. Artificial Intravaginal Insemination Using Fresh Semen in Cats. *J Vet Med Sci.* [Internet]. 2000 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (11): 1163 – 1167. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11129859/>
21. Villaverde AISB, Melo CM, Martin I, Ferreira TH, Papa FO, Taconeli CA, et al. Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen – thawed semen in domestic cat (*Felis catus*). *Anim Reprod Sci.* [Internet]. 2009 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (114): 434 – 432. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19100692/>
22. Swanson WF. Laparoscopic Oviductal Embryo Transfer and Artificial Insemination in Felids – Challenges, Strategies and Successes. *Reprod Dom Anim.* [Internet]. 2012 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (47): 136 – 140. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23279483/>
23. Swanson WF. Practical application of laparoscopic oviductal artificial insemination for the propagation of domestic cats and wild felids. *Reprod Fertil Dev.* [Internet]. 2019 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (31): 27 – 39. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32188540/>
24. Zambelli D, Cunto M. Transcervical artificial insemination in the cat. *Theriogenology.* [Internet]. 2005 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (64): 698 – 705. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15963560/>

25. Romagnoli S, Lopate C. Transcervical Artificial Insemination in Dogs and Cats: Review of the Technique and Practical Aspects. *Reprod Dom Anim.* [Internet]. 2014 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (49): 56 – 63. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25277433/>
26. Chatdarong K, Axner E, Manee-In S, Thuwanut P, Linde-Forsberg C. Pregnancy in the domestic cat after vaginal or transcervical insemination with fresh and frozen semen. *Theriogenology.* [Internet]. 2007 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (68): 1326 – 1333.
27. Zambelli D, Bini C, Cunto M. Endoscopic Transcervical Catheterization in domestic Cat. *Reprod Dom Anim.* [Internet]. 2015 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (50): 13- 16. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25358819/>
28. Howard JG, Barone MA, Donoghue AM, Wildt DE. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *J. Reprod Fert.* [Internet]. 1992 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (96): 175 – 186.
29. Tsutsui T. Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology.* [Internet]. 2006 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (66): 122 – 125. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16723152/>
30. Rijsselaere T, Van Soom. Semen collection, assessment and artificial insemination in the cat. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.* [Internet]. 2010 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (79): 467 – 470. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/230692363_Semen_collection_assessment_and_artificial_insemination_in_cats
31. Roth TL, Wolfe BA, Long JA, Howard J, Wildt DE. Effects of Equine Chorionic Gonadotropin, Human Chorionic Gonadotropin, and Laparoscopic Artificial Insemination on Embryo, Endocrine, and Luteal Characteristics in the Domestic Cat. *Biol Reprod.* [Internet]. 1997 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (57): 165 – 171. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9209095/>
32. Howard JG, Wildt DE. Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids. *Theriogenology* [Internet]. 2009 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (71): 130 – 148. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18996580/>

33. Howard JG, Roth TL, Byers AP, Swanson WF, Wildt DE. Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard. *Biol Reprod* [Internet]. 1997 [Consultado 3 de Agosto]. Volumen (56): 1059 – 1068. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9096891/>
34. Tipkantha W, Thuwanut P, Maikew U, Thongphakdee A, Yapila S, Kamolnorranath S, et al. Successful laparoscopic oviductal artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) in Thailand. *J Zoo Wildl Med* [Internet]. 2017 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (48): 804 – 812. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28920796/>
35. Zambelli D, Buccioli M, Castagnetti C, Belluzi S. Vaginal and cervical anatomic modifications during the oestrus cycle in relation to transcervical catheterization in the domestic cat. *Reprod Dom Anim* [Internet]. 2004 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (39): 76 – 80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15065987/>
36. Thongphakdee A, Sukparangsi W, Comizzoli P, Chatdarong K. Reproductive biology and biotechnologies in wild felids. *Theriogenology* [Internet]. 2020 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (150): 360 – 373. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32102745/>
37. Thongphakdee A, Tipkantha W, Punkong C, Chatdarong K. Monitoring and controlling ovarian activity in wild felids. *Theriogenology* [Internet]. 2018 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (109): 14 – 21. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29258698/>
38. Graham LH, Swanson WF, Brown JL. Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. *Theriogenology* [Internet]. 2000 [Consultado 3 de Agosto de 2020]. Volumen (54): 1117 – 1131. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11131330/>